

N. V. SVERCHKOVA¹, N. S. ZASLAVSKAYA¹, G. V. ZHUK¹,
M. I. POTAPOVICH², V. A. PROKULEVICH³, R. P. LIZUN³,
I. V. NASONOV³, E. I. KOLOMIETS¹

COMPLEX PROBIOTIC INTERFERON-CONTAINING FEED ADDITIVE FOR COMMERCIAL AVICULTURE

¹*Institute of Microbiology, National Academy of Sciences,
Minsk, Belarus, microbio@mbio.bas-net.by*

²*Belarusian State University, Minsk, Belarus, potapovich@bsu.by*

³*S. N Vysheslesky Institute of Experimental Veterinary Research,
Minsk, Belarus, avilab@hotmail.ru*

Complex probiotic feed additive comprising bacterial strains *B. subtilis* BIM B-454 D with high antagonistic and enzymatic activities, *P. agglomerans* 1 Eertz synthesizing carotenoid pigments and protein chicken leucocytic alpha-interferon produced by *E. coli* BL 21 was developed for prevention and treatment of immuno-deficiency and infectious diseases of poultry in commercial aviculture. Laboratory specimen of dry probiotic feed additive was manufactured and its biological efficiency was tested on chicken in vivarium of Vysheslesky Institute of Experimental Veterinary research.

Поступила 05.05.2015 г.

УДК 579.64:632.937.1.05

Е. С. ХУДНИЦКАЯ¹, А. Л. ЛАГОНЕНКО¹,
И. Н. ФЕКЛИСТОВА¹, М. Н. МАНДРИК-ЛИТВИНКОВИЧ²,
Н. В. СВЕРЧКОВА², Л. Н. ВАЛЕНТОВИЧ²

ПОИСК БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДСТВ ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ ОТ БАКТЕРИАЛЬНОГО ОЖОГА

¹*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь
lagonenkoal@mail.ru*

²*Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
valentovich@mbio.bas-net.by*

Из восьми отечественных препаратов для защиты растений шесть («Бактоген», «Фитопротектин», «Фрутин», «Экогрин», «Бетапротектин» и «Энатин») оказались способными подавлять *in vitro* рост ряда штаммов *Erwinia amylovora*. По результатам тестирования препаратов «Бактоген», «Экогрин», «Бетапро-

тектин» и «Энатин» *in vivo* можно заключить, что «Бактоген», «Энатин» и «Экогрин» действительно являются перспективными биологическими агентами в борьбе с бактериальным ожогом, так как их активность была подтверждена на растительном материале.

Введение. Бактериальный ожог плодовых – одно из наиболее экономически значимых заболеваний растений семейства *Rosaceae*, вызываемое грамотрицательными бактериями *Erwinia amylovora*. Впервые это заболевание было обнаружено в США еще в 50-е гг. XVIII в. За полтора столетия возбудитель распространился по всей Северной Америке, принося огромный ущерб, исчисляемый миллионами долларов. В настоящее время 46 стран зарегистрировали присутствие *E. amylovora* на своих территориях [1]. В 2007 г. бактериальный ожог был зарегистрирован на территории Республики Беларусь [2].

Бактериальный ожог плодовых имеет сложный цикл развития, который связан как с биотическими, так и абиотическими факторами [3], поэтому достаточно сложно найти оптимальную стратегию для контроля заболевания. Стандартные мероприятия по борьбе с бактериальным ожогом включают применение медьсодержащих препаратов или антибиотиков [4], удаление пораженных побегов и использование устойчивых сортов растений. К сожалению, препараты, содержащие медь, не обладают достаточной эффективностью, а использование антибиотиков не разрешено во многих странах [4]. Кроме того, применение антибиотиков может приводить к селекции устойчивых штаммов патогена [5]. Биологический контроль бактериального ожога плодовых может служить альтернативой применению химических средств защиты растений. Описано довольно большое количество эффективных антагонистов *E. amylovora*, относящихся к различным видам бактерий – *Pseudomonas fluorescens* [6], *Pantoea agglomerans* [7], *Bacillus subtilis* [8]. Некоторые штаммы этих бактерий уже зарегистрированы в качестве биологических агентов контроля бактериального ожога, а в Германии начаты испытания препаратов, действующими агентами которых являются живые клетки нескольких видов дрожжей [9]. Также перспективными считаются биологические препараты на основе бактериофагов [10].

Цель исследования – поиск потенциальных средств защиты растений от бактериального ожога среди разработанных и зарегистрированных в Беларуси биологических препаратов.

Материалы и методы. В работе были использованы штаммы бактерий *Erwinia amylovora* E1, E2, E3, E4, E5, L3–1, L3–2, L3–8, L3–6, L-13 L3–5 LMG-2024, 1/79, выделенные из растений различных видов на территории Беларуси, Германии и Великобритании [2, 11] и биологические препараты защиты растений «Бактоген», «Аурин», «Немацид», «Фитопротектин», «Фрутин», «Экогрин», «Бетапротектин», «Энатин». Характеристика этих препаратов приведена в табл. 1.

Т а б л и ц а 1. **Использованные в работе биологические препараты для защиты растений**

Название препарата	Характеристика	Источник/ссылка
Бактоген	Биологический препарат против возбудителей грибковых и бактериальных заболеваний растений. Содержит бактерии <i>Bacillus subtilis</i> КМБУ 30043	Предоставлен кафедрой генетики БГУ [12]
Аурин	Биопестицид комплексного действия, предназначен для борьбы с возбудителями корневых гнилей, аскохитозом, мучнистой росой, кладоспориозом, пероноспорозом. Основа препарата – бактерии <i>Pseudomonas aurantiaca</i> КМБУ 498, способные продуцировать феназиновые антибиотики и пирролнитрин	Предоставлен кафедрой генетики БГУ [13]
Немацид	Биологический препарат, основу которого составляют бактерии <i>Pseudomonas putida</i> КМБУ 4308, способные к сверхпродукции пиовердина. Обладает широким спектром действия при защите растений от заболеваний различной этиологии	Предоставлен кафедрой генетики БГУ [14]
Фито-протектин	Биологический препарат на основе <i>Bacillus subtilis</i> БИМ В-334 Д. Предназначен для защиты овощных культур открытого (морковь, капуста) и защищенного грунта (огурец, томат) от комплекса грибных и бактериальных болезней, а также хвойных пород от диплоидиоза	Предоставлен лабораторией средств биологического контроля Института микробиологии НАН Беларуси [15]

Название препарата	Характеристика	Источник/ссылка
Фрутин	Биологический препарат на основе <i>Bacillus subtilis</i> БИМ В-262. Предназначен для защиты яблони, плодовых культур от болезней (парша яблони, бактериальный и европейский рак яблони, груши, вишни, сливы, черешни, серая гниль ягодников); клубнелуковичных и луковичных цветочных культур от фузариоза, серой гнили и пенициллеза; древесных культур от черной и бурой пятнистостей листьев; хвойных пород от диплодиоза	Предоставлен лабораторией средств биологического контроля Института микробиологии НАН Беларуси [16]
Экогрин	Биологический препарат на основе <i>Pseudomonas aurantiaca</i> БИМ В-446. Предназначен для защиты огурца и зеленных культур от болезней в условиях малообъемной гидропоники от серой и корневых гнилей, вызываемых фитопатогенными грибами родов <i>Botrytis</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Pythium</i>	Предоставлен лабораторией средств биологического контроля Института микробиологии НАН Беларуси [17]
Бета-протектин	Биологический препарат на основе <i>Bacillus subtilis</i> БИМ В-439 Д. Предназначен для защиты корнеплодов сахарной, столовой свеклы и моркови от болезней в процессе хранения и при вегетации (кагатная гниль, поясковая парша, фузариозная гниль, бурая гниль), луковичных и клубнелуковичных цветочных культур от серой гнили, пенициллеза и фузариоза	Предоставлен лабораторией средств биологического контроля Института микробиологии НАН Беларуси [18]
Энатин	Биологический препарат на основе <i>Bacillus pumilis</i> БИМ В-263 для биологического контроля патогенной и условно-патогенной микрофлоры животноводческих комплексов	Предоставлен лабораторией средств биологического контроля Института микробиологии НАН Беларуси [19]

Для оценки антагонистической активности биологических препаратов *in vitro* использовали метод отсроченного антагонизма. Колонии исследуемых бактерий заседали медальонами диаметром 1 см на поверхность полноценной питательной агаризованной среды, инкубировали в течение 48 ч при 28 °С и выдерживали

30 мин в парах хлороформа. Наслаивали 4,5 мл 0,7%-ного питательного агара, содержащего 6×10^5 кл/мл тестируемого штамма *E. amylovora*. После 24 ч инкубации при 28 °С измеряли диаметр зон ингибирования роста бактерий *E. amylovora*.

Способность биологических препаратов для защиты растений подавлять развитие симптомов бактериального ожога определяли с использованием техники заражения отдельных листьев груши сорта Белорусская поздняя [20]. Листья груши погружали в 1%-ный раствор гипохлорита натрия на 5 мин, затем промывали трижды в большом объеме стерильной дистиллированной воды. На поверхность листьев в области центральной жилки наносили по 10 мкл суспензии тестируемого препарата, разведенного в соответствии с рекомендациями производителя. Листья помещали на поверхность агаризованной среды в чашках Петри и инкубировали при 24 °С. Спустя 24 ч в области нанесения препарата осуществляли надрез скальпелем центральной жилки каждого листа с последующим нанесением 10 мкл суспензии клеток *E. amylovora* ЕЗ (10^7 кл/мл). Инокулированные листья инкубировали при 24 °С и 16-часовом освещении. Через 3 сут оценивали степень развития некроза растительной ткани.

Результаты и обсуждение. Первоначальный скрининг биологических препаратов защиты растений на способность подавлять рост различных штаммов *E. amylovora* осуществляли с использованием метода отсроченного антагонизма. Результаты экспериментов приведены в табл. 2.

Как видно из данных табл. 2, из 8 исследованных биологических препаратов для защиты растений лишь два – «Аурин» и «Немацид» – не способны ингибировать *in vitro* рост изученных штаммов бактерий *E. amylovora* (рис. 1). В наибольшей степени рост фитопатогена подавляет препарат «Бактоген», содержащий бактерии *Bacillus subtilis* КМБУ 30043.

Для дальнейших исследований были отобраны четыре препарата – «Бактоген», «Экогрин», «Бетапротектин» и «Энатин», характеризующиеся наиболее высокой антагонистической активностью по отношению к возбудителю бактериального ожога плодовых.

Таблица 2. Антагонистическая активность отечественных биологических препаратов для защиты растений

Штамм <i>Erwinia amylovora</i>	Зона ингибирования роста штаммов <i>Erwinia amylovora</i> , см*									
	Аурин	Немацид	Бактерген	Фитопротектин	Фруктин	Экогрин	Бетапротектин	Энатин		
E-1	-	-	3,8 ± 0,08	1,5 ± 0,18	1,6 ± 0,12	4,8 ± 0,06	3,4 ± 0,13	2,9 ± 0,06		
E-2	-	-	6,5 ± 0,17	1,6 ± 0,06	1,3 ± 0,17	4,9 ± 0,09	3,5 ± 0,07	3,0 ± 0,09		
E-3	-	-	6,4 ± 0,12	1,5 ± 0,12	1,7 ± 0,07	4,7 ± 0,09	3,2 ± 0,13	3,1 ± 0,16		
E-4	-	-	4,9 ± 0,08	1,5 ± 0,21	1,6 ± 0,21	5,1 ± 0,08	3,4 ± 0,21	2,9 ± 0,11		
E-5	-	-	6,2 ± 0,17	1,5 ± 0,07	1,4 ± 0,17	4,8 ± 0,12	3,3 ± 0,09	3,2 ± 0,17		
L3-1	-	-	6,5 ± 0,05	1,4 ± 0,12	1,6 ± 0,16	4,7 ± 0,11	2,8 ± 0,16	2,9 ± 0,15		
L3-2	-	-	6,7 ± 0,15	1,3 ± 0,28	1,4 ± 0,09	4,5 ± 0,14	2,9 ± 0,12	3,1 ± 0,21		
L3-5	-	-	6,7 ± 0,30	1,4 ± 0,23	1,4 ± 0,08	4,8 ± 0,06	3,1 ± 0,11	2,7 ± 0,18		
L3-6	-	-	4,4 ± 0,20	1,4 ± 0,09	1,8 ± 0,07	5,1 ± 0,17	3,2 ± 0,08	2,8 ± 0,11		
L3-8	-	-	3,5 ± 0,12	1,4 ± 0,20	1,6 ± 0,17	4,8 ± 0,23	3,3 ± 0,07	2,8 ± 0,10		
L-13	-	-	4,6 ± 0,05	1,6 ± 0,08	1,5 ± 0,21	4,9 ± 0,13	3,5 ± 0,27	3,0 ± 0,13		
LMG-2024	-	-	7,2 ± 0,26	1,5 ± 0,18	1,8 ± 0,13	4,9 ± 0,17	3,2 ± 0,15	2,6 ± 0,17		
1/79	-	-	3,5 ± 0,09	1,4 ± 0,11	1,3 ± 0,14	4,6 ± 0,10	2,6 ± 0,13	2,5 ± 0,09		

Примечание: «-» – отсутствие задержки роста *Erwinia amylovora*.

* Приведены средние значения трех измерений со стандартной ошибкой.

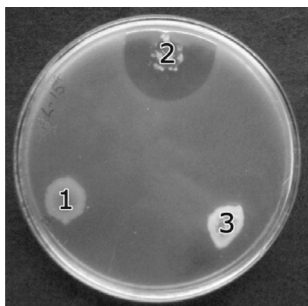


Рис. 1. Влияние биологических препаратов на рост бактерий *Erwinia amylovora*:

1 – Аурин, 2 – Бактоген, 3 – Немацид

Отдельные листья груши обрабатывали препаратами «Бактоген», «Экогрин», «Бетапротектин» и «Энатин» в концентрациях, рекомендуемых производителем. Через 24 ч осуществляли искусственное заражение листьев высоковирулентным штаммом *E. amylovora* ЕЗ. В случае положительного контроля (листья груши, инокулированные патогенном, без предварительной обработки препаратом) на третьи сутки в 100% случаев развивались симптомы бактериального ожога. При обработке листьев груши препаратами «Бактоген»

и «Экогрин» бактериальный ожог развивался лишь в 10% случаев, препаратом «Энатин» – в 30%. Наименьшей эффективностью обладал биологический препарат «Бетапротектин». При его применении поражалось 80% листьев (рис. 2).

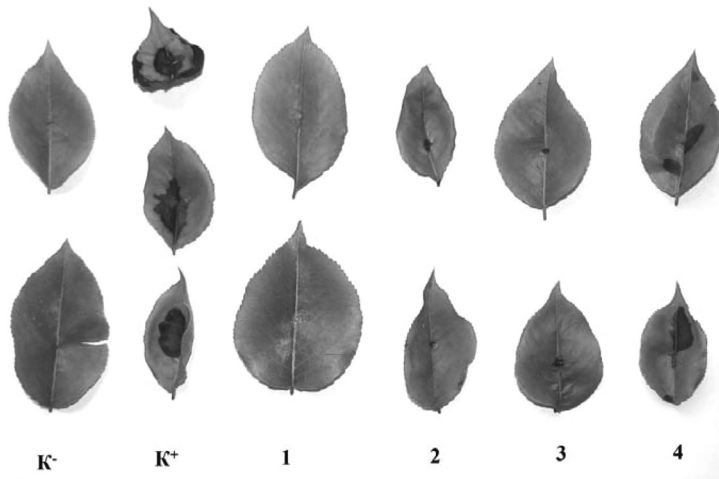


Рис. 2. Проявление симптомов бактериального ожога на листьях *Pyrus communis*: 1 – Бактоген, 2 – Экогрин, 3 – Энатин, 4 – Бетапротектин, K⁺/K⁻ – положительный/отрицательный контроль

На основании проведенной экспериментальной работы по тестированию отечественных биологических препаратов на предмет антагонистической активности против *E. amylovora* можно сделать следующие выводы: из восьми протестированных препаратов шесть («Бактоген», «Фитопротектин», «Фрутин», «Экогрин», «Бетапротектин» и «Энатин») показывали постоянные стабильные положительные результаты *in vitro*: рост всех штаммов *E. amylovora*, использованных в данной работе, был подавлен перечисленными выше биологическими препаратами. Препараты «Бактоген» и «Энатин» эффективно проявили себя в тестах на отдельных листьях груши, что позволяет рассматривать их как перспективные средства для защиты плодовых культур от бактериального ожога.

Для подтверждения полученных результатов в дальнейшем будут проведены эксперименты по оценке эффективности данных препаратов на цветках яблони и груши, определена выживаемость бактерий *Bacillus subtilis* КМБУ 30043 и *Bacillus pumilis* БИМ В-263 на поверхности растений *in vivo*.

Литература

1. EPPO quarantine pest. Data Sheets on Quarantine Pests – *Erwinia amylovora* [Electronic resource]. – Mode of access: http://www.eppo.int/QUARANTINE/bacteria/Erwinia_amylovora/ERWIAM_ds.pdf.
2. First report of *Erwinia amylovora* fire blight in Belarus / A. L. Lagonenko [et al.] // J. Phytopathol. – 2008. – Vol. 156, № 10. – P. 638–640.
3. Johnson, K. B. Fire blight of apple and pear / K. B. Johnson // The Plant Health Instructor. – 2000.
4. Psallidas, P. G. Chemical control of fire blight / P. G. Psallidas, J. Tsiantos // Fire blight: the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora* / ed. by J. L. Vanneste. – Wallingford: CABI, 2000. – P. 199–234.
5. Jones, A. L. The development of streptomycin-resistant strains of *Erwinia amylovora* / A. L. Jones, E. L. Schnabel // Fire blight: the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora* / ed. by J. L. Vanneste. – Wallingford: CABI, 2000. – P. 235–251.
6. Johnson, K. B. Biological control of fire blight / K. B. Johnson, V. O. Stockwell // Fire blight: the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora* / ed. by J. L. Vanneste. – Wallingford: CABI, 2000. – P. 319–337.
7. Zwet, T. V. D. Fire blight: its' nature, prevention, and control: a practical guide to integrated disease management / T. V. D. Zwet, S. V. Beer. – United States Department of Agriculture, 1995. – 91 p.

8. Kleinhempel, H. Biological plant protection / H. Kleinhempel // Acta Biotechnologica. – 1990. – Vol. 10, № 6. – P. 495–499.
9. Yeasts as antagonists against fireblight / A. Seibold [et al.] // EPPO Bull. – 2004. – Vol. 34, № 3. – P. 389–390.
10. Characterization of a new ViI-like *Erwinia amylovora* bacteriophage phiEa2809 / A. L. Lagonenko [et al.] // FEMS Microbiology Letters. – 2015. – Vol. 362, № 7.
11. Кудина, И. В. Характеристика фитопатогенных бактерий *Erwinia amylovora*, выделенных на территории Беларуси / И. В. Кудина, А. Л. Лагоненко, А. Н. Евтушенков // Труды Белорус. гос. ун-та. Сер.: Физиол., биохим. и молекуляр. основы функционирования биосистем. – 2008. – Т. 3, № 1. – С. 182–188.
12. Препарат «Бактоген» ТУ РБ 700068910.010-2002 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://gidroliz.by/production/one/26>.
13. Биопрепарат для комплексной защиты растений АУРИН [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.product.bsu.by/katalog/veschestva-i-materiali/agropromishlennij-kompleks/preparati-dlja-sel-skogo-i-lesnogo-hozjajstva/rastenievodstvo/biopreparat-dlja-kompleksnoj-zaschiti-rastenij-aurin/>.
14. Биопрепарат для защиты растений от галловой нематоды НЕМАЦИД [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.product.bsu.by/katalog/veschestva-i-materiali/agropromishlennij-kompleks/preparati-dlja-sel-skogo-i-lesnogo-hozjajstva/rastenievodstvo/biopreparat-dlja-zaschiti-rastenij-ot-gallovoj-nematodi-nemacid/>.
15. Воронкова, А. Е. Бактерии *Bacillus subtilis* БИМ В-334 Д как основа препарата «Фитопротектин» для защиты овощных культур от болезней: свойства, культивирование, применение: дис. ... канд. биол. наук / А. Е. Воронкова. – Минск, 2005. – 108 с.
16. Фрутин / Институт микробиологии НАН Беларуси [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://mbio.bas-net.by/produkcija-i-uslugi/produkcija_5/shop/frutin/.
17. Бактерии *Pseudomonas aurantiaca* БИМ В-446 – основа биопрепарата Экогрин для защиты овощных и зеленных культур от болезней в условиях малообъемной гидропоники / Э. И. Коломиец [и др.] // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: сб. науч. тр. – Минск, 2012. – Т. 4. – С. 98–107.
18. Бетапротектин / Институт микробиологии НАН Беларуси [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://mbio.bas-net.by/produkcija-i-uslugi/produkcija_5/shop/betaprotektin/.
19. Микробный дезинфектант Энатин / Институт микробиологии НАН Беларуси [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://mbio.bas-net.by/prod/enatin/>.
20. ГРУША БЕЛОРУССКАЯ ПОЗДНЯЯ® [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.belsad.by/site/ru/catalog.html?func=detail&id=62>.

*E. S. KHUDNITSKAYA*¹, *A. L. LAGONENKO*¹, *I. N. FEKLISTOVA*¹,
*M. N. MANDRIK-LITVINKOVICH*², *N. V. SVERCHKOVA*², *L. N. VALETOVICH*²

SEARCH FOR EFFECTIVE BIOLOGICAL PREPARATIONS PROTECTING PLANTS FROM BACTERIAL BLIGHT

¹*Belarusian State University, Minsk, Belarus, lagonenkoal@mail.ru*

²*Institute of Microbiology, National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, Belarus, valentovich@mbio.bas-net.by*

Among eight Belarusian plant protection products six («Bactogen», «Phyto-protectin», «Frutin», «Ecogreen», «Betaprotectin» and «Enatin») were able to inhibit the growth of several strains of *Erwinia amylovora* *in vitro*. According to *in vivo* testing results of four preparations («Bactogen», «Ecogreen», «Betaprotectin» and «Enatin»), we can conclude that «Bactogen», «Enatin» and «Ecogreen» are promising agents for biological control of bacterial blight, since their activity was confirmed by plant trials.

Поступила 24.04.2015 г.

УДК 579.26 + 632.937

*М. В. ШТЕРНШИС, А. А. БЕЛЯЕВ,
Т. В. ШПАТОВА, А. А. ЛЕЛЯК*

УСИЛЕНИЕ РОЛИ МИКРОБНЫХ АГЕНТОВ БИОКОНТРОЛЯ В ЗАЩИТЕ РАСТЕНИЙ

*Новосибирский государственный аграрный университет,
Россия, ngau-smv@ngs.ru*

Продемонстрированы подходы к усилению роли микробных агентов биоконтроля в защите растений на примере энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana* и трех штаммов бактерий-антагонистов рода *Bacillus*. Исследуемый штамм энтомопатогенного гриба *B. bassiana* проявил инсектофунгицидные свойства, что подтверждено экспериментами *in vitro* и модельными полевыми опытами на растениях черной смородины. На примере трех антагонистических штаммов бактерий рода *Bacillus* продемонстрировано их полифункциональное действие на другой значимой для Западной Сибири ягодной культуре – землянике садовой. *B. subtilis*, *B. licheniformis* и *B. amyloliquefaciens* подавляли возбудителя серой гнили *Botrytis cinerea* *in vitro* и в полевых условиях. Фунгицидное и ростостимулирующее действие наиболее выражено у *B. subtilis*.